<전시-P-33>

국내 침엽수 5종 정유의 호흡기 질환 유발 박테리아에 대한 항균 활성

이수연[1], 김선홍[1], 장수경[1], 박미진[2], 최인규[1]
1: 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부, 2: 국립산림과학원

1. 서론

인간의 호흡기는 외부 환경에 노출되어 폐렴(pneumonia)과 같은 호흡기 질환에 감염되기 쉬우며 특히 박테리아에 의한 감염이 50% 이상인 것으로 알려져 있다. 호흡기 질환과 직접적인 관련이 있는 박테리아로는 *Klebsiella pneumoniae, Haemophillus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* 등이 존재하며, 현재 무분별한 항생제의 남용으로 약제 내성을 나타내는 균으로도 보고되고 있다. 식물 정유(essential oil)는 주로 수증기 증류법을 통해 얻어지는 추출물로 휘발성이 높은 테르펜계 화합물로 이루어져 있으며, 광범위의 항미생물 활성(antimicrobial activity)을 나타내는 것으로 알려져 있다. 국내에는 주로 소나무, 잣나무 등과 같은 침엽수종의 수목자원이 풍부하여 이로부터 추출되는 정유에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있으나, 현재까지 호흡기 질환 유발 박테리아에 대한 정유의 항미생물 활성 연구는 드물다. 따라서 본 연구에서는 국내의 대표적 침엽수종으로부터 정유를 추출하여 항생제 내성 및 호흡기 질환을 유발하는 박테리아에 대한 억제 능력을 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시 재료 및 균주

소나무(*Pinus densiflora*), 전나무(*Abies holophylla*), 잣나무(*Pinus koraiensis*), 편백(*Chamaecyparis obtusa*), 낙엽송(*Larix leptolepis*)의 잎은 경기도 수원시에 위치한 서울대학교 농업생명과학대학 칠보산과 태화산 학술림에서 2012년 5월에 채취하였다. 채취된 잎들은 즉시 1~2cm로 절단한 뒤, 수증기 증류 장치에 투입하여 100℃에서 6 시간 이상 추출하였다. 박테리아 *Klebsiella pneumonia* CCARM 0015, *Haemophillus influenzae* CCARM 9001, *Streptococcus pyogenes* CCARM 0032, *Streptococcus pneumoniae* CCRAM 4001, *Neisseria meningitidis* CCARM 0073는 항생제 내성 균주 은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받았다.

2.2 항박테리아 활성

2.2.1 디스크 확산법

먼저 Muller Hinton Agar(MHA) 배지에 순수 배양된 박테리아 집락을 0.9%의 생리식염수에 희석하여 표준 탁도액 McFarland 0.5 기준에 맞추어 부유액을 만들었다. 각 수종의 정유가 10, 5, 2.5 ㎕씩 흡수된 디스크(8 ㎜)를 균이 도말된 MHA 위에 놓고 37℃ 배양기에서 배양하였다. 24시간이 지난 후 눈금자를 이용하여 발육 억제대의 직경을 측정하였다.

2.2.2 최소생장저해농도 측정(MIC, Minimum Inhibitory Concentration)

24 well plate에 기질의 농도를 1/2 씩 희석하여 Muller Hinton Broth(MHB) 배지 내에 최종 농도가 5~0.31 ㎕/㎖ 범위 안에 들도록 한 뒤, 각각의 균 부유액을 1.5×10^5 CFU/㎖의 농도로 첨가하였다. 24시간이 지난 후 균사의 생장이 저해된 농도를 육안으로 확인하였다. 이후 선택된 MIC 농도의 well 부분을 광학현미경(×1000)으로 관찰하고 시간별 박테리아의 Optical Densitiy (OD)를 측정하여 정유의 작용 양상을 살펴보았다.

2.3 분획

TLC (Thin Layer Chromatography) assay를 통해 정유의 분리 양상을 확인한 후, open column chromatography를 이용하여 원액을 분획하였다. 고정상으로는 silica gel 60 (40~100 um)을 사용하였고, 이동상 전개 용매로는 hexane : ethyl acetate (49:1, 16:1, 8:1, 4:1)를 사용하였다. 각각의 분취물들은 TLC plate에 전개한 후, UV 램프 (254 nm, 365 nm)로 관찰하여 Rf (Retention factor) 수치에 따라 fraction 1~5로 분리하였다.

2.4 성분 분석

정유 및 분획물들에 대한 정성 분석을 위해 GC/MS를 이용하였다. GC (model-agilent 6890) column은 DB-5 (60.0 m × 320 ㎛ × 1.8 ㎛)를 사용하였다. 얻어진 시료 피크의 mass data와 표준 library data와의 비교를 통하여 피크의 화합물 구조를 확인하였다. 한편 동일한 조건에서 탄화수소 혼합물 n-alkane (C_8~C_{30})을 분석한 다음, Kovats의 방법에 따라 각 성분의 Retention Index (RI)를 계산하여 이를 문헌상의 RI 값과 비교하여 동정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 항균활성

디스크 확산법에 의한 활성 평가 결과, 5 수종 중 전나무(*A. holophylla*) 정유의 억제 효과가 두드러지게 나타났다. 전나무 정유(10 ㎕)가 흡수된 디스크에 의해 *K. pneumoniae*는 가장 넓은 억제대(15.72 ㎜)를 나타냈으며, *H. influenzae, S. pyogenes, N. meningitis*에 대해서도 다른 수종에 비해 상대적으로 넓은 생장 억제대 (11.60 ~ 12.59 ㎜)가 형성되었다 (표 1).

표 1. 디스크 확산법에 의한 5종 침엽수 정유(10㎕)의 박테리아 생장 억제대 (㎜)

	S. pyogenes	*S. pneumoiae*	*H. influenzae*	*K. pneumoniae*	*N. meningitis*
소나무	-	-	-	-	-
편백	11.17	-	10.6	-	-
낙엽송	-	-	-	-	-
잣나무	-	-	-	-	-
전나무	**12.59**	**-**	**11.60**	**15.72**	**12.08**
Ampicillin	25.47	38.46	28.96	20.04	26.64

3.2 성분분석

전나무 정유의 정성 분석 결과, α-pinene (11.59%), camphene (11.19%), 3-carene (15.04%, d-limonene (17.36%), borneol (4.87%), bornyl acetate (18.00%), β-caryophyllene(2.06%), caryophyllene oxide (2.16%), α-bisabolol (5.47%)이 주요 성분으로 검출되어 결과적으로 monoterpene(83.15%)의 함량이 높게 나타났으며, 상대적으로 sesquiterpene은 12.99%을 차지하고 있었다.

3.3 최소생장저해 농도(MIC)

정유 원액을 분획화한 결과, 화학 구조의 관능기 특징에 따라 분리되는 양상을 나타냈다. 분리된 분획물과 정유 원액에 대한 MIC를 평가한 결과, Fraction 2에서 원액에 비해 낮은 MIC (0.15 ~ 0.31 ㎕/㎖)를 확인하였으며, 다른 분획물에서는 저해 효과를 관찰할 수 없었다(표 2). Fraction 2의 성분 분석 결과 d-limonene(15.45%), β-caryophyllene (5.93%), caryophyllene oxide(55.94%)가 검출되었다.

표 2. 전나무 정유의 원액과 분획물의 최소생장저해 농도 (MIC)

	S. pyogenes	***S. pneumoiae***	***H. influenzae***	***K. pneumoniae***	***N. meningitis***
정유 원액	0.31	0.62	0.62	0.31	0.62
Fraction 1	-	-	-	-	-
Fraction 2	**0.15**	**0.62**	**0.62**	**0.15**	**0.31**
Fraction 3	-	-	-	-	-
Fraction 4	-	-	-	-	-
Fraction 5	-	-	-	-	-

전나무 정유가 0.31㎕/㎖로 첨가된 *K. pnuemoniae*의 세포를 관찰한 결과, 무처리 대조구에 비해 확연히 운동성이 떨어지며 적은 세포수를 관찰하였다. 특히 시간별 *K. pnuemoniae*의 OD 값을 측정한 결과, 전나무 정유 처리구의 경우 대조구와 달리 36시간이 지난 후에도 흡광도가 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 결과를 통해, 전나무 정유는 *K. pnuemoniae*에 대해 정균 효과(bacteriostatic)보다 살균(bacteriacidal)효과를 나타내는 것으로 예상된다. 한편 광학 현미경 관찰 결과 세포 내 구성 물질들의 부재가 예상되며, 이에 대한 좀 더 구체적 결과를 도출하기 위해 전자현미경적 관찰을 시도할 예정이다.

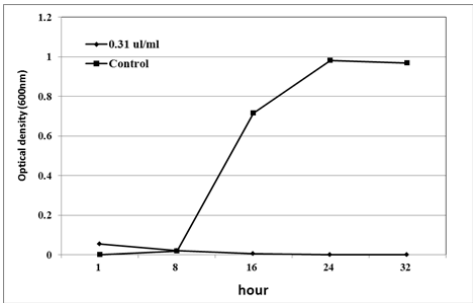

그림 1. 시간별 *K. pneumoniae*의 optical density

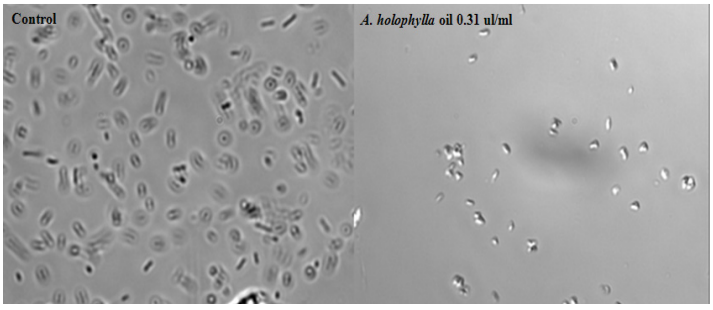

그림 2. 광학현미경 관찰에 의한 *K. pneumoniae* 세포 변화